



Patent
Attorney's Docket No. 017753-137

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of)
)
Etienne REGULIER *et al.*) Group Art Unit: 1632
)
Application No.: 09/762,573) Examiner: Liping Chen
)
Filed: February 8, 2001) Confirmation No.: 5075
)
For: COMPOSITION FOR IMPLEMENTING)
A CYTOTOXIC, IN PARTICULAR AN)
ANTITUMORAL OR ANTIVIRAL)
TREATMENT IN A MAMMAL)

RECEIVED

MAY 14 2003

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

TECH CENTER 1600/2900

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

French Patent Application No. 9907181

Filed: June 8, 1999

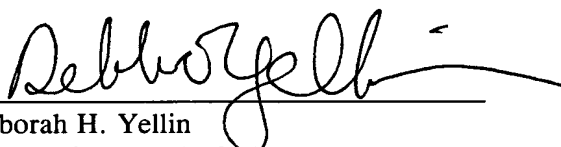
In support of this claim, enclosed is a certified copy of said prior foreign application. Said prior foreign application was referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

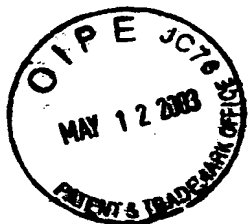
Date: May 12, 2003

By:


Deborah H. Yellin
Registration No. 45,904

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620





BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

RECEIVED

MAY 14 2003

TECH CENTER 1600/2900

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **8 JUIN 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907181**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **08 JUIN 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET REGIMBEAU
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

237894 D18257 JW

01 45 00 92 02

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique, notamment antitumoral
ou antiviral, chez un mammifère**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

TRANSGENE S.A.

Forme juridique

SOCIÉTÉ ANONYME

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

92-1142

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

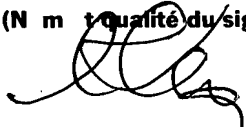
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... / ...
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif) 237894 D18257 JW			
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 07181	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique, notamment antitumoral ou antiviral, chez un mammifère			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
TRANSGENE S.A. : 11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG - FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		REGULIER Etienne	
Prénoms			
Adresse	Rue	197 Avenue de Colmar - 67100 STRASBOURG - FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		ERBS Philippe	
Prénoms			
Adresse	Rue	Les Malteries - 3 Rue Kirschleger - 67000 STRASBOURG - FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (N m t qualité du signataire)			
 92-1234			

**Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement
cytotoxique, notamment antitumoral ou antiviral, chez un mammifère**

La présente invention concerne une composition cytotoxique
5 comprenant une première séquence d'acide nucléique codant pour tout ou
partie d'une chimiokine MIP et une seconde séquence d'acide nucléique
codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité
cytotoxique, notamment antitumorale ou antivirale. La présente invention est
particulièrement utile dans le cadre de la mise en oeuvre d'un traitement par
10 thérapie génique de maladies prolifératives ou infectieuses.

A ce jour, les résultats les plus encourageants obtenus dans le cadre de
traitements antitumoraux concernent des traitements combinés associant un
traitement à base de composés chimiques (chimiothérapie) et un traitement
reposant sur l'utilisation de rayonnements (radiothérapie). Outre les
15 désagréments importants qu'occasionne chez le patient ce type de traitement,
on constate dans un grand nombre de cas que des cellules tumorales, de type
métastatique ou non, persistent chez le sujet traité, pouvant occasionner un
rechute et ne permettant donc pas de rémission complète.

De récents travaux conduits dans le domaine du cancer ont proposé
20 d'adapter les protocoles de thérapie génique à la thérapie antitumorale. A cet
égard, on peut par exemple citer les travaux de Meneguzzi et al., 1991,
Virology, 181, 61-69 relatifs à l'immunisation contre des cellules tumorales à
l'aide d'un vecteur recombinant de la vaccine exprimant les gènes E6 et E7 du
virus du papillome humain de type 16. On peut également citer le contenu du
25 brevet français FR 92/03120 relatif à l'utilisation d'un adénovirus
recombinant exprimant une cytokine dans le cadre d'une thérapie génique
antitumorale.

Les cytokines sont des molécules naturellement produites à la suite
d'une stimulation antigénique ou d'une réaction inflammatoire (Gillis and
30 Williams, 1998, Curr. Opin. Immunol., 10, 501-503) dont l'utilité dans le
cadre du traitement de certains cancers a été montrée notamment par Oettger

(Curr. Opin. Immunol., 1991, 3, 699-705). Ainsi , Leroy et al. (1998, Res.Immunol. 149 (7-8) : 681-684) ont montré que la production de cytokines sur les sites de la tumeur après administration intra-tumorale de vecteurs viraux recombinants permet l'induction d'une réponse immunitaire associée à
 5 une inhibition de la croissance tumorale. Néanmoins, cette réponse antitumorale bien qu'encourageante ne permet pas la disparition définitive des cellules tumorales, et par conséquent la mise en œuvre d'un traitement antitumoral satisfaisant.

Les chimiokines constituent pour leur part une sous classe de la famille
 10 des cytokines. Elles se distinguent des autres cytokines par leur propriété chimio-attractive, notamment lors des processus naturels de chimiotactisme, et notamment d'attraction des cellules du système immunitaire vers les tissus dans lesquels siège l'inflammation ou l'infection, ainsi que par leurs propriétés anti-angiogéniques.

15 Les chimiokines sont des protéines de faible poids moléculaire (entre 8 et 10 kd), de petite taille (de 70 à 80 acides aminés) dont les séquences en acides aminés présentent un faible taux d'homologie (variant de 10 à 70 % selon les chimiokines considérées) permettant de définir à ce jour environ 50 chimiokines différentes. Ces chimiokines peuvent néanmoins être subdivisées
 20 en 4 grandes familles relatives à la position des résidus cystéines qu'elles renferment. Les familles α dont l'extrémité N-terminale comprend 2 cystéines séparées par un acide aminé unique (chimiokines de type IL-8, NAP-2, GCP-2) et β dont l'extrémité N-terminale comprend 2 cystéines adjacentes (chimiokines de type RANTES, MIP1, MCP1) sont les mieux caractérisées
 25 (Horuk, R., 1994, Trends Pharmacol. Sci., 15, pages 159-165 ; Murphy, P.M., 1994, Annu. Rev. Immunol., 12, pages 593-633).

Par ailleurs, le groupe de Dilloo et al. (1996, Nature Medicine, vol. 2, Number 10, 1090-1095) a montré que la co-expression, après administration recombinants chez la souris de fibroblastes modifiés *ex vivo* à l'aide de
 30 vecteurs rétroviraux, d'une chimiokine particulière, la lymphotactine (Lptn), et de l'interleukine-2 (IL2), permet de stimuler la réponse immune antitumorale de l'animal traité. Toutefois, cet effet est limité dans le temps, et ne permet

qu'un contrôle transitoire du volume tumoral et aucune rémission chez les animaux traités.

Il est donc souhaitable de disposer de nouvelles compositions permettant notamment la mise en œuvre de traitements antitumoraux efficaces, aisés à mettre en place, c'est à dire permettant un contrôle prolongé
5 du volume tumoral et l'augmentation du taux de survie des patients traités.

Nous avons maintenant identifié de nouvelles compositions cytotoxiques dont les différents constituants sont choisis de façon à obtenir un effet synergique de leurs activités respectives et des propriétés améliorées desdits
10 constituants. Plus particulièrement, de telles compositions permettent d'inhiber ou de retarder la prolifération cellulaire en induisant la mort spécifique des cellules, notamment tumorales, une meilleure présentation des antigènes et/ou une stimulation des cellules immunes de l'organisme hôte. La présente invention offre une alternative avantageuse et efficace aux techniques
15 de l'art antérieur, notamment pour traiter le cancer de l'homme ou de l'animal.

L'invention concerne en premier lieu une composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique, par exemple antitumoral ou antiviral, ou toute applications nécessitant la mort cellulaire, chez un mammifère comprenant :

20 (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP,

(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des
25 éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

Dans le cadre de la présente invention, il est possible d'utiliser en (i) l'intégralité de la séquence d'acide nucléique codant pour la chimiokine MIP (pour Macrophage Inflammatory Protein, en anglais) ou une partie seulement
30 de ce polypeptide, ou un polypeptide dérivé ou muté, dans la mesure où la fonction et les propriétés de la chimiokine MIP sont conservées. Au sens de la

présente invention, on entend par mutation, une délétion et / ou une substitution et / ou une addition d'un ou plusieurs nucléotides. De même, il est envisageable d'utiliser une séquence codant pour une chimiokine hybride provenant de la fusion de la séquences codant pour une chimiokine de type MIP et de la séquence codant pour au moins une chimiokine d'un autre type (RANTES, MCP 1, ...).

Dans le cadre de la présente invention, la chimiokine MIP préférée est la chimiokine de type MIP 1, et plus particulièrement sélectionnée parmi le groupe consistant en les chimiokines MIP1 α et MIP1 β dont les propriétés ont été mises en évidence par Wolpe et al, 1988, J. Exp. Med, 167, 570-581.

MIP1 α , dont les séquences en acides nucléiques et peptidique sont décrites dans Obaru et al. 1986, J. Biochem. 99, 885-894, dont le contenu est incorporé par référence dans la présente demande, est produite par les lymphocytes T et les monocytes. Elle permet la chimio-attraction des éosinophiles et des lymphocytes T au cours des infections des voies respiratoires ; des monocytes et des neutrophiles au cours d'arthrites rhumatoïdales, d'inflammations du système digestif ou de méningites d'origine bactérienne. En outre, elle inhibe la prolifération des précurseurs hématopoïétiques.

MIP1 β , dont les séquences en acides nucléiques et peptidique sont décrites dans Brown et al. 1989, J. Immunol. 142, 679-68, dont le contenu est incorporé par référence dans la présente demande, est également produite par les lymphocytes T et les monocytes. Elle exerce ses propriétés chimio-attractives sur les monocytes et les neutrophiles dans les cas arthrites osseuses et les méningites bactériennes. Comme MIP1 α , elle inhibe la prolifération des précurseurs hématopoïétiques.

Il existe des variants naturels desdites protéines MIP1 α et MIP1 β qui sont connus de l'homme de l'art et qui portent par exemple les noms GOS19, LD78, pAT464 , TY5 (de souris) ou SIS α (de souris) pour MIP1 α ou pAT744, Act-2, G-26, H-400 (de souris) ou hSIS γ (de souris) pour MIP1 β . Dans le cas particulier de MIP1 β , on choisira par exemple la séquence correspondant à

Act-2 (Lipes et al., 1988, PNAS, 85, 9704-9708, dont le contenu est incorporé ici en référence).

Par « polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique », on entend désigner toute substance peptidique susceptible d'induire ou d'activer une
5 réponse immune dirigée spécifiquement contre une cellule tumorale (l'activité cytotoxique est alors appelée activité antitumorale) ou une cellule infectée par un virus (l'activité cytotoxique est alors appelée activité antivirale) ou d'inhiber la croissance et / ou la division d'une telle cellule, notamment tumorale ou infectée. Selon un cas préféré, ladite activité cytotoxique se traduit par la mort
10 de ladite cellule. Selon un cas particulier, il serait également possible d'utiliser des compositions selon la présente invention dans des cas pathologiques associés à une prolifération cellulaire, telle que par exemple les phénomènes de restenose.

L'activité de chimio-attraction d'un polypeptide donné, notamment
15 dérivé de la chimiokine MIP, sur des cellules impliquées dans les réactions immunes (telles que par exemple des eosinophiles, des lymphocytes T, des monocytes ou des neutrophiles peut être évaluée par un test de chimiotactisme (Maghazachi, 1993, Nature Immunity, 12, 57). De même, ce type de chimiokine inhibant la prolifération des précurseurs
20 hématopoïétiques, il est possible d'évaluer une telle propriété *in vitro* selon Graham et al., 1992, Growth Factors, 7, 151.

L'activité cytotoxique d'un polypeptide donné, notamment une activité antitumorale, peut être évaluée *in vitro* par la mesure de la survie cellulaire soit par des tests de viabilité à court terme (tel que par exemple le test au bleu
25 tryptan ou MTT), soit par des tests de survie clonogénique (formation de colonies) (Brown et Wouters, 1999, Cancer Research, 59, 1391-1399) ou *in vivo* par la mesure de la croissance des tumeurs (taille et/ou volume) dans un modèle animal (Ovejera et Houchens, 1981, Semin. Oncol., 8, 386-393).

Selon une première variante, l'invention concerne une composition
30 caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est choisi parmi les cytokines, les protéines codées par un gène appelé « gène suicide » et les facteurs protéiques antiangiogéniques.

Plus particulièrement, lorsque ledit polypeptide en (ii) est une cytokine, il s'agit préférentiellement d'une cytokine choisie parmi les interférons α , β et γ , les interleukines, et notamment l'IL-2, l'IL-4 l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, les facteurs nécrosant des tumeurs (TNF) et les facteurs stimulateurs de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...).

Selon un mode de réalisation préféré, ladite cytokine est sélectionnée parmi l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron gamma (IFN- γ). L'interleukine-2 est notamment responsable de la prolifération des lymphocytes T activés, de la multiplication et de l'activation des cellules du système immunitaire (pour la séquence en acide nucléique voir notamment FR 85 09480). L'IFN- γ active les cellules phagocytaires et accroît l'expression des antigènes de surfaces de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (pour la séquence en acide nucléique voir notamment FR 85 09225). Lesdites séquences en acide nucléique sont incorporées par référence dans la présente demande.

Selon un autre mode de réalisation, la composition selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend en (ii) au moins deux séquences d'acide nucléique codant pour tout ou partie de l'interleukine-2 (IL-2) et tout ou partie de l'interféron gamma (IFN- γ).

Selon une seconde variante, l'invention concerne également une telle composition caractérisée en ce que ledit polypeptide en (ii) présente au moins une activité enzymatique sélectionnée parmi l'activité thymidine kinase, l'activité purine nucleoside phosphorylase, l'activité guanine ou uracile ou orotate phosphoribosyl transférase et l'activité cytosine désaminase.

Plusieurs études ont permis d'identifier des polypeptides qui ne sont pas toxiques en tant que tels mais qui présentent des propriétés enzymatiques catalytiques capables de transformer une substance inactive (prédrogue), par exemple un nucléoside ou un analogue de nucléoside, en substance hautement toxique pour la cellule, par exemple un nucléoside modifié qui peut être incorporé dans les chaînes d'ADN ou d'ARN en élongation, avec pour conséquence, notamment, l'inhibition de la division cellulaire ou des dysfonctionnements cellulaires conduisant à la mort de la cellule renfermant

de tels polypeptides. Les gènes codant pour de tels polypeptides sont dits « gènes suicides ». De nombreux couples gène suicide/prédrogue sont actuellement disponibles. On peut citer plus particulièrement, les couples :

- la thymidine kinase du virus herpès simplex de type 1 (TK HSV-1) et
- 5 l'acyclovir ou le ganciclovir (GCV) (Caruso et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7024-7028 ; Culver et al., 1992, Science 256, 1550-1552 ; Ram et al., 1997, Nat. Med. 3, 1354-1361) ;
- le cytochrome p450 de rat et la cyclophosphamide (Wei et al., 1994, Human Gene Therapy 5, 969-978) ;
- 10 - la purine nucleoside phosphorylase d'*Escherichia coli* (*E. Coli*) et la 6-méthylpurine deoxyribonucleoside (Sorscher et al., 1994, Gene Therapy 1, 233-238) ;
- la guanine phosphoribosyl transférase d'*E. coli* et la 6-thioxanthine (Mzoz et Moolten, 1993, Human Gene Therapy 4, 589-595) et
- 15 - la cytosine désaminase (CDase) et la 5-fluorocytosine (5FC).

Plus particulièrement, la CDase est un enzyme qui intervient dans la voie métabolique des pyrimidines par laquelle la cytosine exogène est transformée par le biais d'une désamination hydrolytique en uracile. Des activités CDases ont été mises en évidence chez les procaryotes et les

20 eucaryotes inférieurs (Jund et Lacroute, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615 ; Beck et al., 1972, J. Bacteriol. 110, 219-228 ; De Haan et al., 1972, Antonie van Leeuwenhoek 38, 257-263 ; Hoeprich et al., 1974, J. Inf. Dis. 130, 112-118 ; Esders et Lynn, 1985, J. Biol. Chem. 260, 3915-3922) mais elles sont absentes chez les mammifères (Koechlin et al., 1966, Biochem Pharmacol. 15,

25 435-446 ; Polak et al., 1976, Chemotherapy 22, 137-153). Les gènes *FCY1* de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) et *codA* d'*E. coli* codant respectivement pour la CDase de ces deux organismes sont connus et leurs séquences publiées (EP 402 108 ; Erbs et al., 1997, Curr. Genet. 31, 1-6 ; WO93/01281).

La CDase désamine également un analogue de la cytosine, la 5-fluorocytosine (5-FC) en 5-fluorouracile (5-FU) qui est un composé hautement cytotoxique notamment lorsqu'il est converti en 5-fluoro-UMP (5-FUMP). Les cellules dépourvues d'activité CDase, en raison soit d'une mutation inactivante
 5 du gène codant pour l'enzyme, soit de leur déficience naturelle pour cette enzyme (par exemple les cellules mammifères) sont résistantes au 5-FC (Jund et Lacroute, 1970, *J. Bacteriol.* 102, 607-615 ; Kilstrup et al., 1989, *J. Bacteriol.* 1989 171, 2124-2127). Par contre, il a été montré qu'il est possible de transmettre la sensibilité au 5-FC à des cellules mammifères dans
 10 lesquelles la séquence codant pour une activité CDase a été transférée (Huber et al., 1993, *Cancer Res.* 53, 4619-4626 ; Mullen et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 33-37 ; WO 93/01281). De plus, dans ce cas, les cellules avoisinantes non transformées deviennent également sensibles au 5-FC (Huber et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8302-8306). Ce phénomène,
 15 appelé effet de voisinage (bystander en anglais), est dû à l'excrétion par les cellules exprimant l'activité CDase, de 5-FU qui intoxique les cellules voisines par simple diffusion à travers la membrane cellulaire. Cette propriété de diffusion passive du 5-FU constitue un avantage par rapport au système de référence *tk/GCV* pour lequel l'effet de voisinage nécessite un contact avec les
 20 cellules qui expriment *tk* (Mesnil et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1831-1835). Cet effet constitue par conséquent un atout supplémentaire de l'utilisation de la CDase dans le cadre de la thérapie génique, notamment anticancéreuse.

Cependant, la sensibilité au 5-FC varie beaucoup selon les lignées
 25 cellulaires. Une faible sensibilité est observée par exemple dans des lignées tumorales humaines PANC-1 (carcinome de pancréas) et SK-BR-3 (adénocarcinome du sein) transduites par un rétrovirus exprimant le gène *codA* d'*E. Coli* (Harris et al., 1994, *Gene Therapy* 1, 170-175). Ce phénomène indésirable pourrait s'expliquer par l'absence ou la faible conversion endogène
 30 du 5-FU formé par l'action enzymatique de la CDase en 5-FUMP cytotoxique. Cette étape, normalement assurée dans les cellules mammifères par l'orotate phosphorybosyl transférase (Peters et al., 1991, *Cancer* 68, 1903-1909), peut

être absente dans certaines tumeurs et rendre ainsi la thérapie génique, basée sur la CDase, inopérante.

Chez les procaryotes et eucaryotes inférieurs, l'uracile est transformée en UMP par l'action de l'uracile phosphoribosyl transférase (présentant par conséquent une activité UPRTase). Cette enzyme convertit également le 5-FU en 5-FUMP. Ainsi des mutants *fur1* de la levure *S. cerevisiae* sont résistants à de fortes concentrations de 5-FU (10 mM) et de 5-FC (10 mM) car en absence d'activité UPRTase, le 5-FU, provenant de la désamination du 5-FC par la CDase, n'est pas transformé en 5-FUMP cytotoxique (Jund et Lacroute, 1970, J. Bacteriol. 102, 607-615). Les gènes *upp* et *FUR1* codant pour l'UPRTase respectivement d'*E. coli* et de *S. cerevisiae* ont été clonés et séquencés (Andersen et al., 1992, Eur. J. Biochem. 204, 51-56 ; Kern et al., 1990, Gene 88, 149-157).

Au sens de la présente invention, un polypeptide ayant une activité UPRTase désigne un polypeptide capable de convertir l'uracile ou un de ses dérivés en un analogue monophosphaté et, en particulier la 5-FU en 5-FUMP. Par « mutation », il faut entendre l'addition, la délétion et/ou la substitution d'un ou plusieurs résidus à un endroit quelconque dudit polypeptide.

L'UPRTase native dont il est question dans la présente invention peut être d'une origine quelconque, notamment procaryotique, fongique ou de levure. A titre illustratif, les séquences d'acide nucléique codant pour les UPRTases d'*E. coli* (Anderson et al., 1992, Eur. J. Biochem 204, 51-56), de *Lactococcus lactis* (Martinussen et Hammer, 1994, J. Bacteriol. 176, 6457-6463), de *Mycobacterium bovis* (Kim et al., 1997, Biochem Mol. Biol. Int 41, 1117-1124) et de *Bacillus subtilis* (Martinussen et al., 1995, J. Bacteriol. 177, 271-274) peuvent être utilisées dans le cadre de l'invention. Mais on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre une UPRTase de levure et notamment celle codée par le gène *FUR1* de *S. cerevisiae* dont la séquence divulguée dans Kern et al. (1990, Gene 88, 149-157) est introduite ici par référence. A titre indicatif, les séquences des gènes et celles des UPRTases correspondantes peuvent être trouvées dans la littérature et les banques de données spécialisées (SWISSPROT, EMBL, Genbank, Medline...).

Par ailleurs, la demande PCT/FR99/00904 décrit un gène *FUR1* dépourvu de 105 nucléotides en 5' de la partie codante permettant la synthèse d'une UPRTase délétée des 35 premiers résidus en position N-terminale et débutant à la méthionine en position 36 dans la protéine native. Le produit
5 d'expression du gène mutant, désigné *FUR1Δ105*, est capable de compléter un mutant *fur1* de *S. cerevisiae*. En outre, le mutant tronqué présente une activité UPRTase supérieure à celle de l'enzyme native. Ainsi, selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, le polypeptide codé selon l'invention est un mutant de délétion d'une UPRTase native. La délétion
10 est de préférence localisée dans la région N-terminale de l'UPRTase d'origine. Elle peut être totale (concerner l'ensemble des résidus de ladite région N-terminale) ou partielle (concerner un ou plusieurs résidus continus ou non dans la structure primaire). D'une manière générale, un polypeptide est constitué de parties N-terminale, centrale et C-terminale, chacune
15 représentant environ le tiers de la molécule. Par exemple, l'UPRTase de *S. cerevisiae* ayant 251 acides aminés, sa partie N-terminale est constituée des 83 premiers résidus débutant à la méthionine dite initiatrice située en première position de la forme native. Quant à l'UPRTase d'*E. coli*, sa partie N-terminale couvre les positions 1 à 69.

20 En outre, les demandes de brevet WO96/16183 et PCT/FR99/00904 décrivent l'utilisation d'une protéine de fusion codant pour une enzyme à deux domaines ayant les activités CDase et UPRTase et démontrent que le transfert d'un gène hybride *codA::upp* ou *FCY1::FUR1* ou *FCY1::FUR1Δ105* porté par un plasmide d'expression augmente la sensibilité au 5-FC de cellules B16
25 transfectées. Les séquences protéiques et nucléiques décrites dans ces deux demandes sont incorporées dans la description de la présente demande. Selon ce mode de réalisation, le polypeptide est un polypeptide fusionné en phase avec au moins un second polypeptide. Bien que la fusion puisse avoir lieu à un endroit quelconque du premier polypeptide, les extrémités N ou C-terminales sont préférées et notamment l'extrémité N-terminale. Une fusion
30 des activités CDase et UPRTase permet d'améliorer la sensibilité des cellules cibles à la 5-FC et à la 5-FU.

L'homme de l'art est capable de cloner les séquences de CDase ou UPRTase à partir des données publiées, de procéder à d'éventuelles mutations, de tester les activités enzymatiques des formes mutantes dans un système acellulaire ou cellulaire selon la technologie de l'art ou en suivant le protocole
5 indiqué dans la demande PCT/FR99/00904 et de fusionner, notamment en phase, les polypeptides d'activité CDase et UPRTase, et par conséquent tout ou partie des gènes correspondants.

Par conséquent, selon un cas précis, la composition de l'invention est caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique (ii) est sélectionnée parmi
10 les séquences nucléiques des gènes CodA, upp, FUR1, FCY1 et FUR1Δ105, ou par une combinaison de tout ou partie desdites séquences.

L'invention concerne plus particulièrement une dite composition caractérisée en ce que ledit polypeptide en (ii) présente au moins une activité CDase et une activité UPRTase.

15 Par « combinaison de séquences d'acide nucléique » on entend désigner aussi bien des séquences distinctes qui codent pour au moins deux polypeptides distincts que des séquences fusionnées qui codent pour des polypeptides de fusion, étant entendu que la production de tels polypeptides peut être réalisée sous le contrôle des mêmes éléments de régulation (cassette
20 polycistronique) ou d'éléments indépendants, identiques ou différents, homologues ou hétérologues vis à vis du vecteur les renfermant, constitutifs ou inductibles.

Selon un mode particulier de réalisation, la composition de l'invention comprend au moins une séquence d'acide nucléique (ii) codant pour un
25 polypeptide de fusion dans lequel un premier polypeptide présentant une activité UPRTase ou CDase est fusionné en phase avec au moins un second polypeptide, ledit second polypeptide présentant une activité CDase ou UPRTase, respectivement. Plus particulièrement, un tel polypeptide est caractérisé en ce que la fusion avec le second polypeptide est réalisée à
30 l'extrémité N-terminale dudit premier polypeptide.

Selon un cas préféré, ladite composition est caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique codant pour ledit polypeptide de fusion est une séquence hybride comprenant :

- une première séquence d'acide nucléique codant pour un premier polypeptide présentant une activité UPRTase ou CDase,
- une seconde séquence d'acide nucléique codant pour un second polypeptide présentant une activité Cdase ou UPRTase, respectivement.

Une telle séquence d'acide nucléique hybride codant pour ledit polypeptide de fusion peut en outre renfermer une séquence de type IRES.

L'invention concerne notamment une telle composition pour laquelle la première séquence d'acide nucléique est sélectionnée parmi upp, FUR1 et FUR1 Δ 105, et en ce que la seconde séquence d'acide nucléique est sélectionnée parmi CodA et FCY1, et vice-versa. De manière tout à fait préférée, une telle séquence d'acide nucléique hybride est choisie parmi les séquences hybrides décrites dans les demandes de brevet WO96/16183 et PCT/FR99/00904.

Selon une troisième variante, la composition selon la présente invention est caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique (ii) est un facteur protéique anti-angiogénique. L'angiogénèse est le processus responsable de la formation de nouveaux capillaires à partir du réseau vasculaire déjà existant. Ce processus complexe est finement régulé dans les tissus sains par la balance des effets de nombreux facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques. Cependant, dans certaines pathologies, et notamment lors de la formation d'une tumeur, ce processus est dérégulé : les facteurs angiogéniques prennent le pas sur les facteurs anti-angiogéniques ce qui permet une vascularisation importante des tumeurs et par voie de conséquence leur développement rapide et / ou l'apparition de métastases. C'est pourquoi, dans le cadre de la présente invention, un facteur anti-angiogénique est considéré comme étant un agent cytotoxique, notamment antitumoral. Parmi les différents facteurs anti-angiogéniques connus à l'heure actuelle on peut notamment citer l'angiostatine, l'endostatine, le facteur

plaquettaire PF4, la thrombospondine-1, le PRP (pour Proliferin Related Protein), le VEGI (pour Vascular Endothelial Growth Inhibitor) les metalloprotéases et l'urokinase.

5 Les séquences d'acide nucléique (i) ou (ii) peuvent être aisément obtenues par clonage, par PCR ou par synthèse chimique selon les techniques conventionnelles en usage. Il peut s'agir de gènes natifs ou dérivés de ces derniers par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides. Par ailleurs, leur séquences sont largement décrites dans la littérature consultable par l'homme de l'art.

10 La présente invention a également trait à une composition telle que présentée ci-dessus caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) sont insérées dans un vecteur recombinant d'origine plasmidique ou virale, ainsi qu'à un tel vecteur recombinant portant de telles séquences nucléotidiques placées sous le contrôle des éléments nécessaires à
15 leur expression dans une cellule hôte. Les séquences d'acide nucléique (i) et (ii) peuvent être présentes en un ou plusieurs exemplaires sur un même vecteur.

Plus particulièrement, les compositions de l'invention peuvent comprendre lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) insérées dans un même vecteur recombinant ou dans des vecteurs recombinants distincts.

20 Par « vecteur recombinant » selon l'invention, on entend désigner un « vecteur d'origine plasmidique ou virale, et éventuellement un tel vecteur associé à une ou plusieurs substances améliorant l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité dudit vecteur et/ou la protection dudit vecteur *in vivo* à l'égard du système immunitaire de l'organisme hôte. Ces substances sont
25 largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman , 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342 ; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A titre illustratif mais non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes, de
30 protéines nucléaires ou virales ou encore de lipides neutres. Ces substances peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Des exemples de tels composés sont notamment disponibles dans les demandes de brevet WO

98/08489, WO 98/17693, WO 98/34910, WO 98/37916, WO 98/53853, EP 890362 ou WO 99/05183. Une combinaison envisageable est un vecteur recombinant plasmidique associé à des lipides cationiques (DOGS, DC-CHOL, spermine-chol, spermidine-chol etc...) et des lipides neutres (DOPE).

5 Le choix des plasmides utilisables dans le cadre de la présente invention est vaste. Il peut s'agir de vecteurs de clonage et/ou d'expression. D'une manière générale, ils sont connus de l'homme de l'art et nombre d'entre eux sont disponibles commercialement mais il est également possible de les construire ou les modifier par les techniques de manipulation génétique. On
10 peut citer à titre d'exemples les plasmides dérivés de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) ou encore p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201). De préférence, un plasmide mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention contient une origine de replication assurant l'initiation de la replication dans une cellule
15 productrice et/ou une cellule hôte (par exemple, on retiendra l'origine ColE1 pour un plasmide destiné à être produit dans *E. coli* et le système oriP/EBNA1 si l'on désire qu'il soit autoreplicatif dans une cellule hôte mammifère, Lupton et Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542 ; Yates et al., Nature 313, 812-815). Il peut en outre comprendre un gène de sélection permettant de
20 sélectionner ou identifier les cellules transfectées (complémentation d'une mutation d'auxotrophie, gène codant pour la résistance à un antibiotique...). Bien entendu, il peut comprendre des éléments supplémentaires améliorant son maintien et/ou sa stabilité dans une cellule donnée (séquence *cer* qui favorise le maintien monomérique d'un plasmide (Summers et Sherrat, 1984,
25 Cell 36, 1097-1103, séquences d'intégration dans le génome cellulaire).

S'agissant d'un vecteur viral, on peut envisager un vecteur dérivant d'un poxvirus (virus de la vaccine, notamment MVA, canaripox... etc), d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un foamyvirus ou d'un virus associé à l'adénovirus. On aura de préférence
30 recours à un vecteur non réplcatif et non intégratif. A cet égard, les vecteurs adénoviraux conviennent tout particulièrement à la mise en oeuvre de la présente invention. Toutefois, il convient de noter ici que dans le cadre de la

mise en oeuvre de la présente invention, la nature du vecteur revêt peu d'importance.

Les rétrovirus ont la propriété d'infecter et de s'intégrer majoritairement dans les cellules en division et à cet égard sont particulièrement appropriés pour l'application cancer. Un rétrovirus recombinant selon l'invention comporte généralement les séquences LTR, une région d'encapsidation et la séquence nucléotidique selon l'invention placée sous le contrôle du LTR rétroviral ou d'un promoteur interne tels que ceux décrits ci-après. Il peut dériver d'un rétrovirus d'une origine quelconque (murin, primate, félin, humain etc...) et en particulier du MoMuLV (Moloney murine leukemia virus), MVS (Murine sarcoma virus) ou Friend murine retrovirus (Fb29). Il est propagé dans une lignée d'encapsidation capable de fournir *en trans* les polypeptides viraux gag, pol et/ou env nécessaires à la constitution d'une particule virale. De telles lignées sont décrites dans la littérature (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc...). Le vecteur rétroviral selon l'invention peut comporter des modifications notamment au niveau des LTR (remplacement de la région promotrice par un promoteur eucaryote) ou de la région d'encapsidation (remplacement par une région d'encapsidation hétérologue, par exemple de type VL30) (voir les demandes françaises 94 08300 et 97 05203).

On pourra également avoir recours à un vecteur adénoviral défectif pour la réplication c'est à dire dépourvu de tout ou partie d'au moins une région essentielle à la réplication sélectionnée parmi les régions E1, E2, E4 et. Une délétion de la région E1 est préférée. Mais elle peut être combinée à d'autres modification(s)/délétion(s) touchant notamment tout ou partie des régions E2, E4 et/ou L1-L5, dans la mesure où les fonctions essentielles défectives sont complémentées *en trans* au moyen d'une lignée de complémentation et/ou d'un virus auxiliaire afin d'assurer la production des particules virales d'intérêt. A cet égard, on peut avoir recours aux vecteurs de seconde génération de l'état de la technique (voir par exemple les demandes internationales WO94/28152 et WO97/04119). A titre illustratif, la délétion de la majorité de la région E1 et de l'unité de transcription E4 est tout particulièrement avantageuse. Dans le but d'augmenter les capacités de

clonage, le vecteur adénoviral peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région E3 non essentielle. Selon une autre alternative, on peut mettre en oeuvre un vecteur adénoviral minimal retenant les séquences essentielles à l'encapsidation, à savoir les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsidation. Par ailleurs, l'origine du vecteur adénoviral selon l'invention, peut être variée aussi bien du point de vue de l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome d'un adénovirus d'origine humaine ou animale (canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine, simienne...) ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral d'au moins deux origines différentes. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., Arch. Virol., 1993, 128: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, J. Gen. Virol., 1989, 70: 165-172 ; Jouvenne et al., Gene, 1987, 60: 21-28 ; Mittal et al., J. Gen. Virol., 1995, 76: 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de sérotype C, notamment de type 2 ou 5. Un vecteur adénoviral selon la présente invention peut être généré in vitro dans *Escherichia coli* (*E. coli*) par ligation ou recombinaison homologue (voir par exemple la demande internationale WO96/17070) ou encore par recombinaison dans une lignée de complémentation. Les différents vecteurs adénoviraux ainsi que leurs techniques de préparation sont connus (voir par exemple Graham et Preveet, 1991, in *Methods in Molecular Biology*, vol 7, p 109-128 ; Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc).

Les éléments nécessaires à l'expression sont constitués par l'ensemble des éléments permettant la transcription de la séquence nucléotidique en ARN et la traduction de l'ARNm en polypeptide, notamment les séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'excrétion ou l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Ces éléments peuvent être régulables ou constitutifs. Bien entendu, le promoteur est adapté au vecteur retenu et à la cellule hôte. On peut citer, à titre d'exemples, les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycérate Kinase), MT (metallothioneine ; Mc Ivor et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848), α -1

antitrypsine, CFTR, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine, pour le surfactant pulmonaire, immunoglobuline, β -actine (Tabin et al., 1982, Mol. Cell Biol. 2, 426-436), SR α (Takebe et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 466-472), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus), le LTR du RSV (Rous Sarcoma Virus), le promoteur de MPSV, le promoteur TK-HSV-1, le promoteur précoce du virus CMV (Cytomegalovirus), les promoteurs du virus de la vaccine p7.5K pH5R, pK1L, p28, p11 et les promoteurs adénoviraux E1A et MLP ou une combinaison desdits promoteurs. Il peut également s'agir d'un promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin. Invest. 96, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748), tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175) et α -fétoprotéine surexprimée dans les cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 461-465). Le promoteur précoce du CytomégaloVirus (CMV), ou celui du RSV, est tout particulièrement préféré. Il est également possible d'utiliser une région promotrice tissu-spécifique, notamment lorsque la tumeur à traiter est issue d'un type cellulaire particulier, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Les éléments nécessaires peuvent, en outre, inclure des éléments additionnels améliorant l'expression de la séquence nucléotidique selon l'invention ou son maintien dans la cellule hôte. On peut citer notamment les séquences introniques (WO 94/29471), séquences signal de sécrétion, séquences de localisation nucléaire, sites internes de réinitiation de la traduction de type IRES, séquences poly A de terminaison de la transcription.

Selon un mode de réalisation préféré, l'invention concerne plus particulièrement un vecteur recombinant, notamment un vecteur viral, et plus spécifiquement un vecteur adénoviral defectif pour la réplication, comprenant :

(i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP,

(ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

5 lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte et étant définies comme indiqué ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une particule virale, notamment adénovirale, comprenant un vecteur viral recombinant selon
10 l'invention. Une telle particule virale peut être générée à partir d'un vecteur viral selon toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art. Sa propagation est effectuée notamment dans une cellule de complémentation adaptée aux déficiences dudit vecteur. S'agissant d'un vecteur adénoviral, on aura par exemple recours à une lignée de complémentation telle que décrite
15 dans la demande WO 94/28152, à la lignée 293 établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain, qui complémente efficacement la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72), la lignée A549-E1 (Imbler et al., 1996, Gene Therapy 3, 75-84) ou une lignée permettant une double complémentation (Yeh et al., 1996, J. Virol. 70, 559-565 ; Krougliak et
20 Graham, 1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586 ; Wang et al., 1995 Gene Therapy 2, 775-783 ; demande internationale WO 97/04119). On peut également employer des virus auxiliaires pour compléter au moins en partie les fonctions défectives. Par cellule de complémentation, on entend une cellule capable de fournir *en trans* les facteurs précoces et/ou tardifs
25 nécessaires à l'encapsidation du génome viral dans une capside virale pour générer une particule virale contenant le vecteur recombinant. Ladite cellule peut ne pas compléter à elle seule toutes les fonctions défectives du vecteur et dans ce cas peut être transfectée/transduite par un vecteur/virus auxiliaire apportant les fonctions complémentaires.

30 L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule virale, selon lequel :

- (i) on introduit un vecteur recombinant selon l'invention dans une cellule, notamment une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une dite cellule transfectée,
- 5 (ii) on cultive ladite cellule transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et
- (iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

Bien entendu, la particule virale peut être récupérée du surnageant de culture mais également à partir des cellules. Une des méthodes couramment
10 employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un
15 gradient de chlorure de césium...).

L'invention a également trait à une cellule hôte eucaryote comprenant les fragments d'ADN présents dans la composition selon l'invention. Ladite cellule hôte est avantageusement une cellule de mammifère et, de préférence, une cellule humaine. Il s'agira de préférence d'une cellule 293, LCA4 ou
20 PERC6. Une telle cellule est notamment utile pour produire les particules virales à haut titre, sans générer de particules compétentes pour la réplication. L'invention concerne également une cellule hôte comprenant une séquence nucléotidique, un vecteur recombinant selon l'invention ou infectée par une particule virale selon l'invention. Aux fins de la présente invention,
25 une cellule hôte est constituée par toute cellule transfectable par un vecteur recombinant ou infectable par une particule virale, tels que définis ci-avant. Une cellule de mammifère et notamment humaine convient tout particulièrement. Elle peut comprendre ledit vecteur sous forme intégrée dans le génome ou non (épisode). Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale
30 d'une origine quelconque, notamment hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...), musculaire

(cellule satellite, myocyte, myoblaste, muscle lisse...), cardiaque, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

L'invention concerne également une composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement antitumoral ou antiviral, ou toute applications
5 nécessitant la mort cellulaire, chez un mammifère comprenant :

(i) tout ou partie du polypeptide MIP,

(ii) tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

lesdits polypeptides étant définis comme indiqué précédemment.

10 Un autre objet selon l'invention consiste en une formulation destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique, notamment antitumoral ou antiviral, chez un mammifère caractérisée en ce qu'elle comporte une composition (à base d'acides nucléiques ou de polypeptides telle que décrite
15 précédemment), un vecteur adénoviral ou une particule virale selon l'invention, ainsi qu'un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Un tel support est préférentiellement isotonique, hypotonique ou faiblement hypertonique et présente une force ionique relativement faible, tel que par exemple une solution de sucre. Par ailleurs, un tel support peut renfermer
20 tout solvant, ou liquide aqueux ou partiellement aqueux tel que de l'eau stérile non pyrogène. Le pH de la formulation est en outre ajusté et tamponné afin de répondre aux exigences d'utilisation *in vivo*. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même que des agents de solubilisation, de stabilisation, de préservation. Pour une administration injectable, on préfère une
25 formulation en solution aqueuse, non-aqueuse ou isotonique. Elle peut être présentée en dose unique ou en multidose sous forme liquide ou sèche (poudre, lyophilisat...) susceptible d'être reconstituée de manière extemporanée par un diluant approprié.

Selon un mode particulier de l'invention, ladite formulation comporte en
30 outre des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une

prodrogue capable d'être transformée en molécule cytotoxique par un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique.

Une telle prodrogue sera notamment sélectionnée dans le groupe consistant en l'acyclovir ou le ganciclovir (GCV), la cyclophosphamide, la
5 6-méthylpurine deoxyribonucleoside, la 6-thioxanthine, la cytosine ou un de ses dérivés ou l'uracile ou un de ses dérivés. De manière tout à fait préférée, ladite prodrogue est la 5-fluorocytosine (5FC) ou la 5-fluorouracile (5-FU).

Par ailleurs, notamment dans le cadre de formulations renfermant une composition selon la seconde variante évoquée ci-dessus, il convient de noter
10 que ladite formulation peut également comprendre une ou plusieurs substances potentialisant l'effet cytotoxique du 5-FU. On peut citer en particulier, les drogues inhibant les enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines (par exemple celles citées ci-après), les drogues telles que la Leucovorin (Waxman et al., 1982, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18, 685-692) qui
15 en présence du produit du métabolisme du 5-FU (5-FdUMP) augmente l'inhibition de la thymidylate synthase ce qui entraîne une diminution du pool de dTMP nécessaire à la réplication et enfin les drogues telles que le méthotrèxate (Cadman et al., 1979, Science 250, 1135-1137) qui en inhibant la dihydrofolate réductase et en élevant le pool d'incorporation de PRPP
20 (phosphoribosylpyrophosphate) provoque l'augmentation de 5-FU dans l'ARN cellulaire.

Une formulation selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement préventif ou curatif de maladies par thérapie génique et s'adresse
25 plus particulièrement aux maladies prolifératives (cancers, tumeurs, resténose...etc) et aux maladies d'origine infectieuse, notamment virale pour lesquelles il est nécessaire de limiter la prolifération des cellules infectées (induites par les virus de l'hépatite B ou C, le HIV, l'herpès, les rétrovirus....etc).

Une formulation selon l'invention peut être fabriquée de manière
30 conventionnelle en vue d'une administration par voie locale, parentérale ou digestive. Les voies d'administration envisageables sont multiples. On peut

citer par exemple la voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale. Pour ces trois derniers modes de réalisation, une administration par aérosol ou instillation est avantageuse.

5 L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu, de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. Les préparations à base de particules virales selon l'invention

10 peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} ufp (unités formant des plages), avantageusement 10^5 et 10^{13} ufp et, de préférence, 10^6 et 10^{12} ufp. Pour ce qui est du vecteur recombinant selon l'invention, des doses comprenant de 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence 0,05 à 10 mg et, de manière tout à fait préférée, 0,5 à 5 mg peuvent être envisagées. Une

15 composition à base de polypeptides comprend de préférence de 0,05 à 10 g et, de manière tout à fait préférée, de 0,5 à 5 g dudit polypeptide. Bien entendu, les doses peuvent être adaptées par le clinicien.

La présente invention est également relative à l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'une composition, d'un vecteur recombinant ou d'une

20 particule virale selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique, notamment pour la préparation d'un médicament cytotoxique, notamment antitumoral ou antiviral, destiné à inhiber la croissance ou provoquer le rejet d'une tumeur ou la mort d'une cellule infectée. Selon une première possibilité, le médicament

25 peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible ou à sa périphérie, dans les poumons par aérosol, dans le système vasculaire au moyen d'une sonde appropriée...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse,

30 lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient. Une utilisation préférée consiste à traiter ou prévenir les cancers, tumeurs et maladies résultant d'une prolifération cellulaire non désirée. Parmi

les applications envisageables, on peut citer les cancers du sein, de l'utérus (notamment ceux induits par les papillomas virus), de la prostate, du poumon, de la vessie, du foie, du colon, du pancréas, de l'estomac, de l'oesophage, du larynx du système nerveux central et du sang (lymphomes, leucémie etc...).

5 Elle est également utile dans le cadre des maladies cardiovasculaires, par exemple pour inhiber ou retarder la prolifération des cellules de muscles lisses de la paroi vasculaire (resténose). Enfin pour ce qui est des maladies infectieuses, l'application au SIDA peut être envisagée.

Il est par ailleurs envisageable, le cas échéant et sans sortir du cadre de la

10 présente invention, de procéder à des administrations simultanées ou successives par des voies différentes des différents composants compris dans la composition ou la formulation pharmaceutique selon l'invention.

L'invention s'étend également à une méthode pour le traitement des maladies par thérapie génique, caractérisée en ce que l'on administre à un

15 organisme ou à une cellule hôte ayant besoin d'un tel traitement une séquence nucléotidique, un vecteur recombinant, une particule virale ou une cellule hôte selon l'invention.

Lorsque la méthode de traitement met en oeuvre une séquence nucléotidique, un vecteur recombinant ou une particule virale permettant

20 l'expression d'un polypeptide selon l'invention ayant une activité UPRTase, il peut être avantageux d'administrer en outre une seconde séquence nucléotidique codant pour un second polypeptide présentant une activité CDase, ladite seconde séquence nucléotidique étant portée par ledit vecteur recombinant ou particule virale ou par un vecteur ou une particule virale

25 indépendante. Dans ce dernier cas, l'administration des séquences UPRTase et CDase peut être simultanée ou consécutive, l'ordre d'administration étant sans importance.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'utilisation thérapeutique ou la méthode de traitement comprend également une étape supplémentaire

30 selon laquelle on administre à l'organisme ou la cellule hôte des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une prédrogue,

avantageusement d'un analogue de cytosine et, en particulier de la 5-FC. A titre illustratif, une dose de 50 à 500 mg/kg/jour peut être employée avec une préférence pour 200 mg/kg/jour. Dans le cadre de la présente invention, la prédrogue est administrée selon les pratiques standards et ceci de manière
5 préalable, concomittante ou encore postérieure à celle de l'agent thérapeutique selon l'invention. La voie orale est préférée. On peut administrer une dose unique de prédrogue ou des doses répétées pendant un temps suffisamment long pour permettre la production du métabolite toxique au sein de l'organisme ou de la cellule hôte.

10 Selon une mode avantageux de l'invention, l'utilisation thérapeutique ou la méthode de traitement est associée à un second traitement du patient par chirurgie (notamment par ablation de la tumeur partiellement ou totalement), par radiothérapie ou chimiothérapie. Dans ce cas particulier, le traitement selon l'invention est appliqué de manière préalable, concomitante
15 ou fait suite audit second traitement. De manière préféré, ce traitement sera appliqué suite audit second traitement.

Les exemples qui suivent ont pour but d'illustrer les différents objets de la présente invention et n'ont par conséquence aucun caractère limitatif.

La figure 1 représente l'évolution du volume tumoral chez des souris B6D2
20 implantées avec des cellules tumorales B16F0.

La figure 2 représente le taux de survie de ces mêmes souris. Des groupes de 15 souris sont traités à l'aides de compositions comprenant des adénovirus exprimant les gènes suivants : huMIP α , huIL2, huMIP1 α +huIL2, Ad vide.

25 La figure 3 représente l'évolution du volume tumoral chez des souris B6D2 implantées avec des cellules tumorales RENCA.

La figure 4 représente le taux de survie de ces mêmes souris. Des groupes de 15 souris sont traités à l'aides de compositions comprenant des adénovirus exprimant les gènes suivants : huMIP β , huIL2, huMIP β +huIL2,
30 Ad vide.

La figure 5 représente l'évolution du volume tumoral chez des souris B6D2 implantées avec des cellules tumorales P815.

La figure 6 représente le taux de survie de ces mêmes souris. Des groupes de 15 souris sont traités à l'aide de compositions comprenant des adénovirus exprimant les gènes suivants : Tampon Tris, huMIP α + huIL2, huMIP1 α + muIFN γ , huIL2 + muIFN γ .

5

EXEMPLES :

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de recombinaison homologue sont de préférence réalisées dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées ou transduites et cultivées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier.

Modèles tumoraux :

Trois modèles de cellules tumorales ont été choisis afin d'évaluer l'activité de la composition de l'invention : P815 (mastocytome H-2d, décrite dans Dunn et al, 1957, J.Natl. Cancer Inst., 18, 587-590), B16FO (mélanome H-2b, décrite dans Wu et al, 1996, Cancer Res., 56, 21-26) et RENCA (carcinome rénal H-2d, décrite dans Murphy et al, 1973, J.Natl.Cancer Inst., 50(4), 1023-1025). Les cellules (3E+5 pour chaque modèle de tumeur) sont implantées à J-7 /J-11 en sous cutané dans le flanc droit de souris B6D2 âgées de 6 à 8 semaines.

Administration des compositions cytotoxiques de l'invention :

Un volume de 100 μ l de vecteurs adénoviraux (5×10^8 unités infectieuses) est injecté directement dans les tumeurs lorsque leur volume avoisine 4 à 10 mm³ (J0). Cette injection est répétée dans les mêmes conditions à J1 et J2.

L'efficacité de la composition de l'invention administrée est contrôlée par la mesure de la taille des tumeurs ainsi que par la mesure du temps de survie des souris traitées avec le cas échéant un contrôle du statut immunologique de l'animal par ELISPOT, test CTL, ... Les animaux peuvent en outre être ensuite soumis à un challenge contra-latéral au cours duquel une dose létale de cellules tumorales est administrée à l'animal pré-traité.

EXEMPLE 1 :

Construction de pTG13010 (huMIP10).

L'ADNc de MIP1 α humain (Numéro d'accension auprès de GenBank : X03754 ; séquence incorporée à la demande par référence) a été assemblé par oligonucléotides synthétiques suivant la séquence décrite par Obaru, K. & al. 1986, J. Biochem. 99 (3), 885-894. Cet ADNc a été introduit dans un vecteur dérivé de pBluescript pour donner le vecteur pTG13006.

Le fragment NotI-Asp718 de pTG13006 renfermant le gène MIP1 α est isolé et introduit dans le vecteur pTG8347 clivé par ces mêmes enzymes, pour donner le vecteur de transfert pTG13008. A titre indicatif, pTG8347 est un vecteur p polyII (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) dans lequel sont insérées les séquences Ad5 1 à 458, le promoteur RSV, les séquences d'épissage de l'intron 2 de la bêta-globine 1 de lapin, les séquences de polyadénylation de la bêta-globine 1 de lapin et les séquences Ad5 3328-5788. Une telle construction est à la portée de l'homme de l'art, notamment sur la base de la demande française 97 06757. Le vecteur adénoviral pTG13010 est reconstitué par recombinaison dans la souche *E. coli* BJ 5183 entre le fragment PacI-BstEII de pTG13008 et le vecteur pTG6624 (décrit dans la demande française 97 06757) linéarisé par ClaI. A titre indicatif, pTG6624 correspond au plasmide p poly II portant le génome Ad5 délété des régions E1

(nt 459 à 3327) et E3 (nt 28592 à 30470) la cassette d'expression de MIP étant insérée à la place de E1.

La construction finale pTG13010 contient le génome Ad5 délété de l'essentiel des régions E1 (nt 459 à 3328) et E3 (nt 28249 à 30758) et en lieu
 5 et place de E1, une cassette pour l'expression du gène MIP1 α placé sous le contrôle du promoteur RSV et des séquences d'épissage de l'intron 2 de la bêta-globine 1 de lapin. Les particules adénovirales sont générées par transfection dans une lignée de complémentation de la fonction E1, par exemple la lignée 293 (ATCC CRL1573) selon les techniques de l'art (Graham
 10 et Prevec, 1991, *Methods in Molecular Biology* Vol7, Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed E.J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ).

Construction de pTG13023 (huMIP1 β / variant Act2).

L'ADNc de MIP1 β humain (Numéro d'accession GenBank : J04130 ; séquence incorporée à la demande par référence) a été assemblé par
 15 oligonucléotides synthétiques suivant la séquence décrite par Lipes, M.A. et al. 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (24), 9704-9708. Cet ADNc a été introduit dans un vecteur dérivé de M13TG130 (KIENY et al. 1983, *Gene*, 26, 91-99) pour donner le vecteur M13TG13013.

Le fragment *NotI*-Asp718 de M13TG13013 renfermant le gène MIP1 β
 20 est isolé et introduit dans le vecteur pTG8347 clivé par ces mêmes enzymes, pour donner le vecteur de transfert pTG13015. Une telle construction est à la portée de l'homme de l'art, notamment sur la base de la demande française 97 06757. Le vecteur adénoviral pTG13023 est reconstitué par recombinaison dans la souche *E. coli* BJ 5183 entre le fragment *PacI*-*BstEII* de pTG13015 et
 25 le vecteur pTG6624 (décrit dans la demande française 97 06757) linéarisé par *ClaI*.

La construction finale pTG13023 contient le génome Ad5 délété de l'essentiel des régions E1 (nt 459 à 3328) et E3 (nt 28249 à 30758) et en lieu
 et place de E1, une cassette pour l'expression du gène MIP1 β placé sous le
 30 contrôle du promoteur RSV et des séquences d'épissage de l'intron 2 de la β globine 1 de lapin. Les particules adénovirales sont générées par transfection dans une lignée de complémentation de la fonction E1, par exemple la lignée 293 (ATCC CRL1573) selon les techniques de l'art (Graham et Prevec, 1991,

Methods in Molecular Biology Vol7, Gene Transfer and Expression Protocols ;
Ed E.J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ).

EXEMPLE 2 :

5 **Expériences *in vivo*.**

Afin d'évaluer la capacité des compositions de l'invention à inhiber la
croissance des tumeurs *in vivo*, 3.10^5 cellules B16F0 sont injectées à (J =
-10/-7) dans des souris immunocompétentes B6D2. Dès que les tumeurs
deviennent palpables (J=0) différentes compositions (voir la légende des figures
10 1 à 6) sont injectées à trois reprises (J0, J1, J2) par voie intra-tumorale à une
dose de 5.10^8 unités infectieuses.

Les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation des taux
de survie (figures 1, 3 et 5) associée à une baisse des volumes tumoraux
(figures 2, 4 et 6) chez les souris traitées avec les compositions comprenant un
15 adénovirus exprimant MIP1 α ou MIP1 β associé à l'IL2 ou l'IFN γ . Ces résultats
confirment bien l'intérêt des composition de l'invention dans la mise en œuvre
d'un traitement antitumoral.

Les souris ainsi traitées sont ensuite soumises à un challenge contra-
latéral consistant en une administration dans les conditions décrites
20 précédemment d'une dose létale (3.10^5 cellules) de cellules tumorales à
J80/J100. On a ainsi constaté que les résultats décrits ci-dessus sont en
outre assortis d'un état immunitaire de la souris tel qu'aucune tumeur n'est
capable de se développer après cette étape de challenge.

REVENDECATIONS.

1. Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique chez un mammifère comprenant :

5 (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'une chimiokine MIP,

 (ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

 lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des
10 éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte dudit mammifère.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite chimiokine MIP est la chimiokine MIP1, et plus particulièrement sélectionnée parmi le groupe consistant en les chimiokines MIP1 α et MIP1 β .

15 3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est choisi parmi les cytokines, les protéines codées par les gènes suicides et les facteurs protéiques anti-angiogéniques.

 4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce
20 que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est une cytokine choisie parmi les interférons α , β et γ , les interleukines, les facteurs nécrosant des tumeurs et les facteurs stimulateurs de colonies.

5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est l'interleukine-2 (IL-2).

25 6. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est l'interféron gamma (IFN- γ).

7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend en (ii) au moins deux séquences d'acide nucléique codant

pour tout ou partie de l'interleukine-2 (IL-2) et tout ou partie de l'interféron gamma (IFN- γ).

8. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide présente au moins une activité cytotoxique sélectionnée parmi l'activité thymidine kinase, l'activité purine nucleoside phosphorylase, l'activité guanine phosphoribosyl transférase et l'activité cytosine désaminase.

9. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit polypeptide présente au moins une activité CDase et une activité UPRTase.

10. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide ayant une activité cytotoxique est un facteur protéique anti-angiogénique choisi parmi l'angiostatine, l'endostatine, le facteur plaquettaire PF4, la thrombospondine-1, le PRP, le VEGF, les métalloprotéases et l'urokinase.

11. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) sont insérées dans un vecteur recombinant d'origine plasmidique ou virale.

12. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) sont insérées dans le même vecteur recombinant.

13. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce que lesdites séquences d'acide nucléique (i) et (ii) sont insérées dans des vecteurs recombinants distincts.

14. Vecteur comprenant :

- (i) une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou d'une chimiokine MIP,
- (ii) au moins une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

lesdites séquences d'acide nucléique étant placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte.

15. Vecteur selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.

5 16. Particule virale comprenant un vecteur selon la revendication 15.

17. Procédé de préparation d'une particule virale selon la revendication 16, selon lequel :

(i) on introduit un vecteur viral selon la revendication 15 dans une cellule capable de produire ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule
10 transfectée,

(ii) on cultive ladite cellule transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et

(iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

18. Composition destinée à la mise en oeuvre d'un traitement
15 cytotoxique chez un mammifère comprenant :

(i) tout ou partie d'un polypeptide MIP,

(ii) tout ou partie d'un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique,

selon laquelle lesdits polypeptides (i) et (ii) sont tels que définis dans les
20 revendications 1 à 10.

19. Formulation destinée à la mise en oeuvre d'un traitement cytotoxique chez un mammifère caractérisée en ce qu'elle comporte une composition selon l'une des revendications 1 à 13, un vecteur selon les revendications 14 ou 15, une particule virale selon la revendication 16, ou
25 une composition selon la revendication 18, ainsi qu'un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

20. Formulation selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle comporte des quantités acceptables d'un point de vue pharmaceutique d'une

prodrogue capable d'être transformée en molécule cytotoxique par un polypeptide ayant au moins une activité cytotoxique.

21. Formulation selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite prodrogue est sélectionnée parmi la 5-fluorouracile (5-FU) et la 5-fluorocytosine ((5-FC).

22. Utilisation d'une composition selon les revendications 1 à 13, d'un vecteur selon les revendications 14 à 15, d'une particule virale selon la revendication 16, ou d'une composition selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament cytotoxique.

10

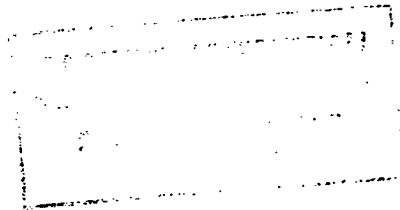
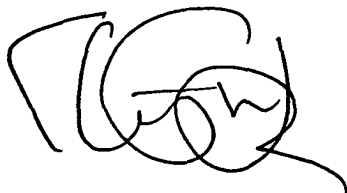
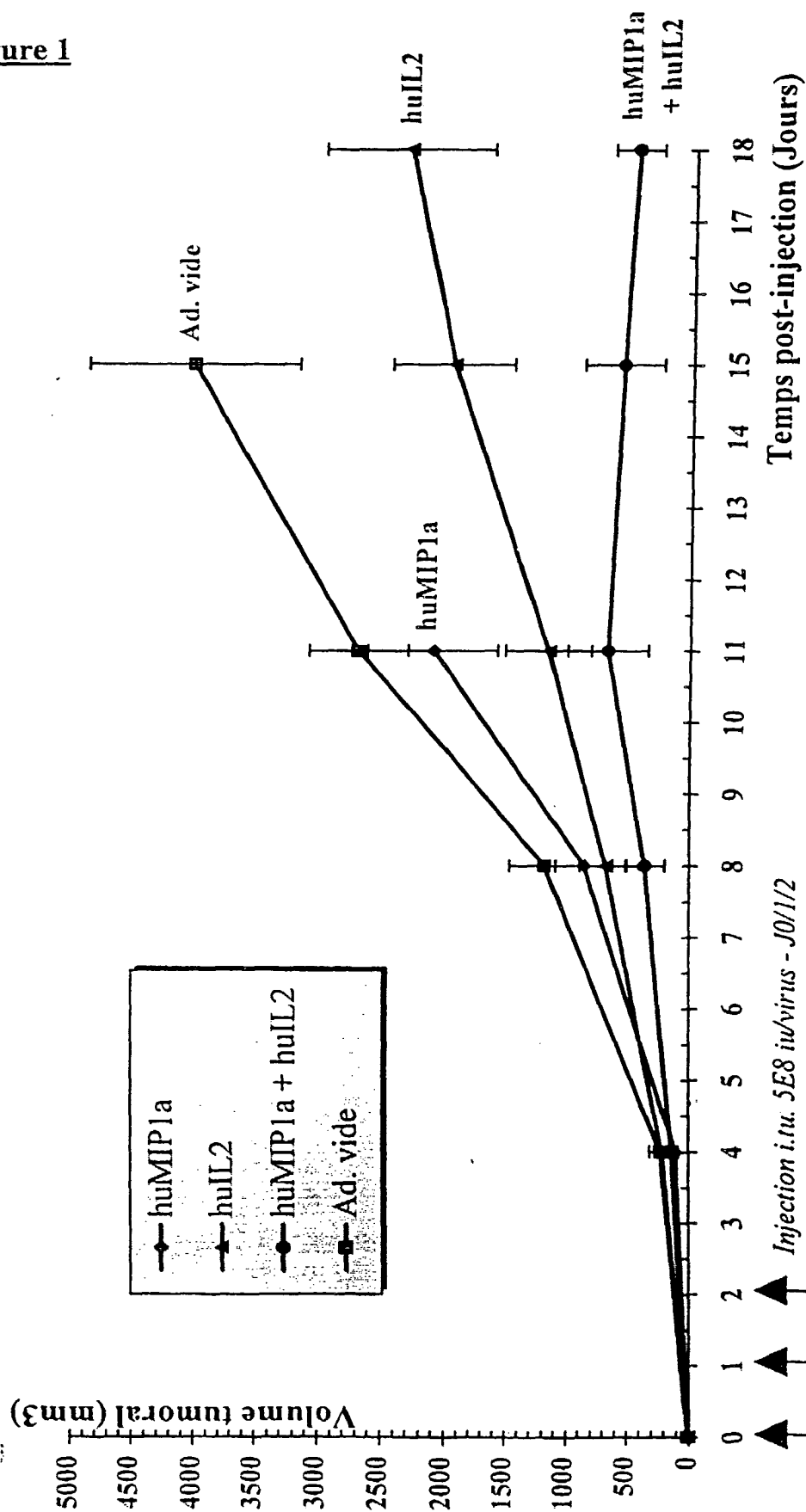


Figure 1



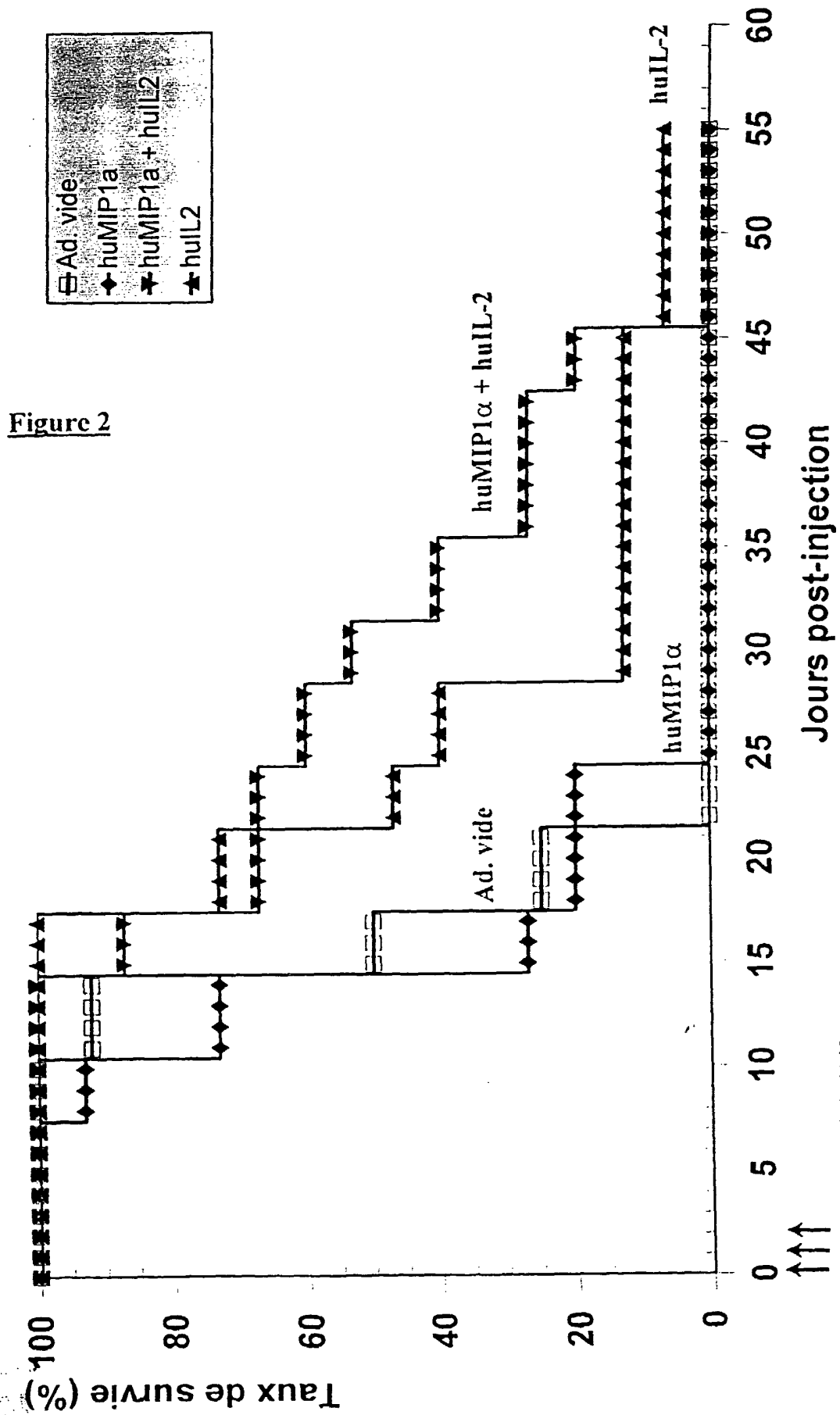
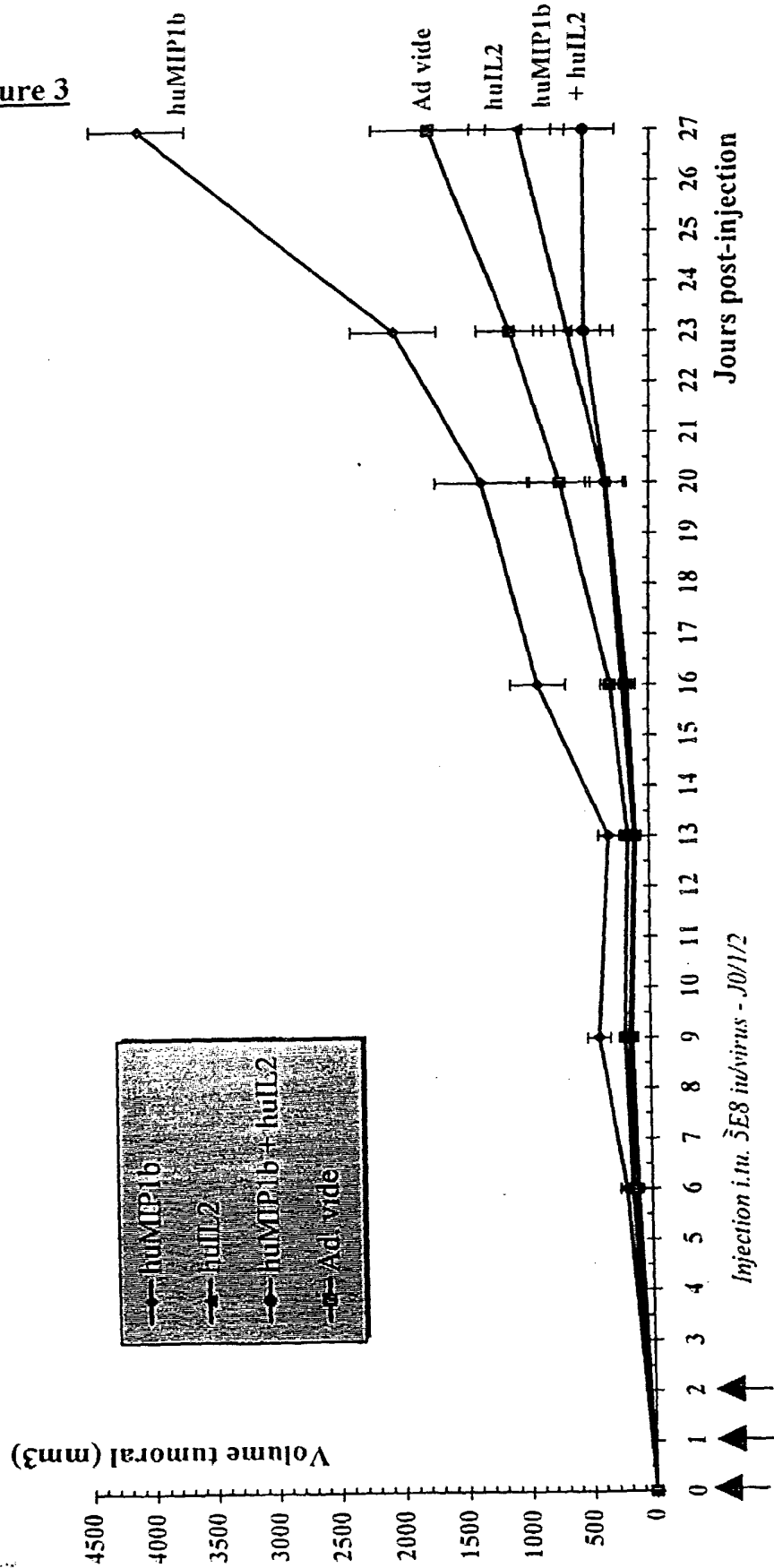


Figure 3



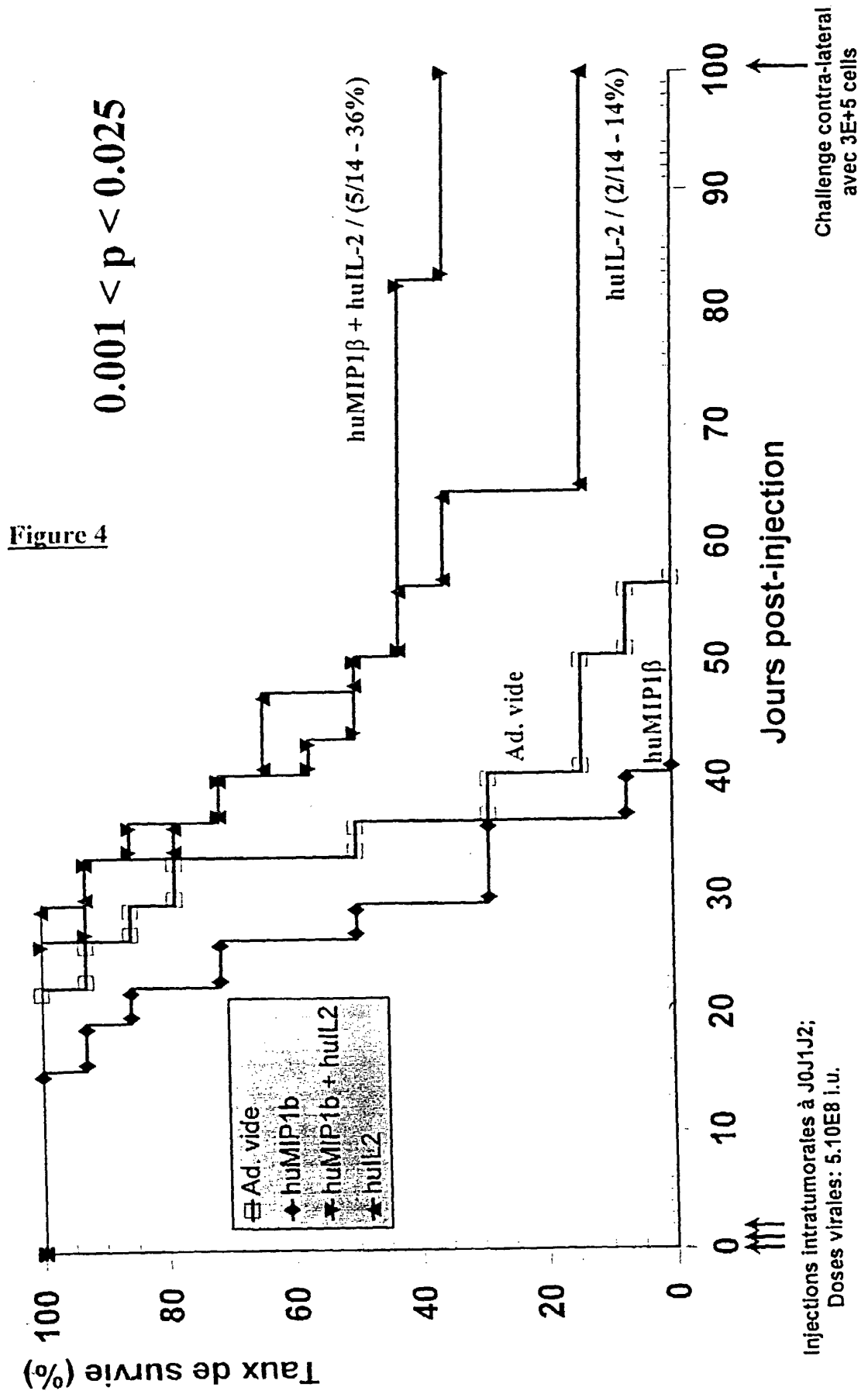


Figure 5

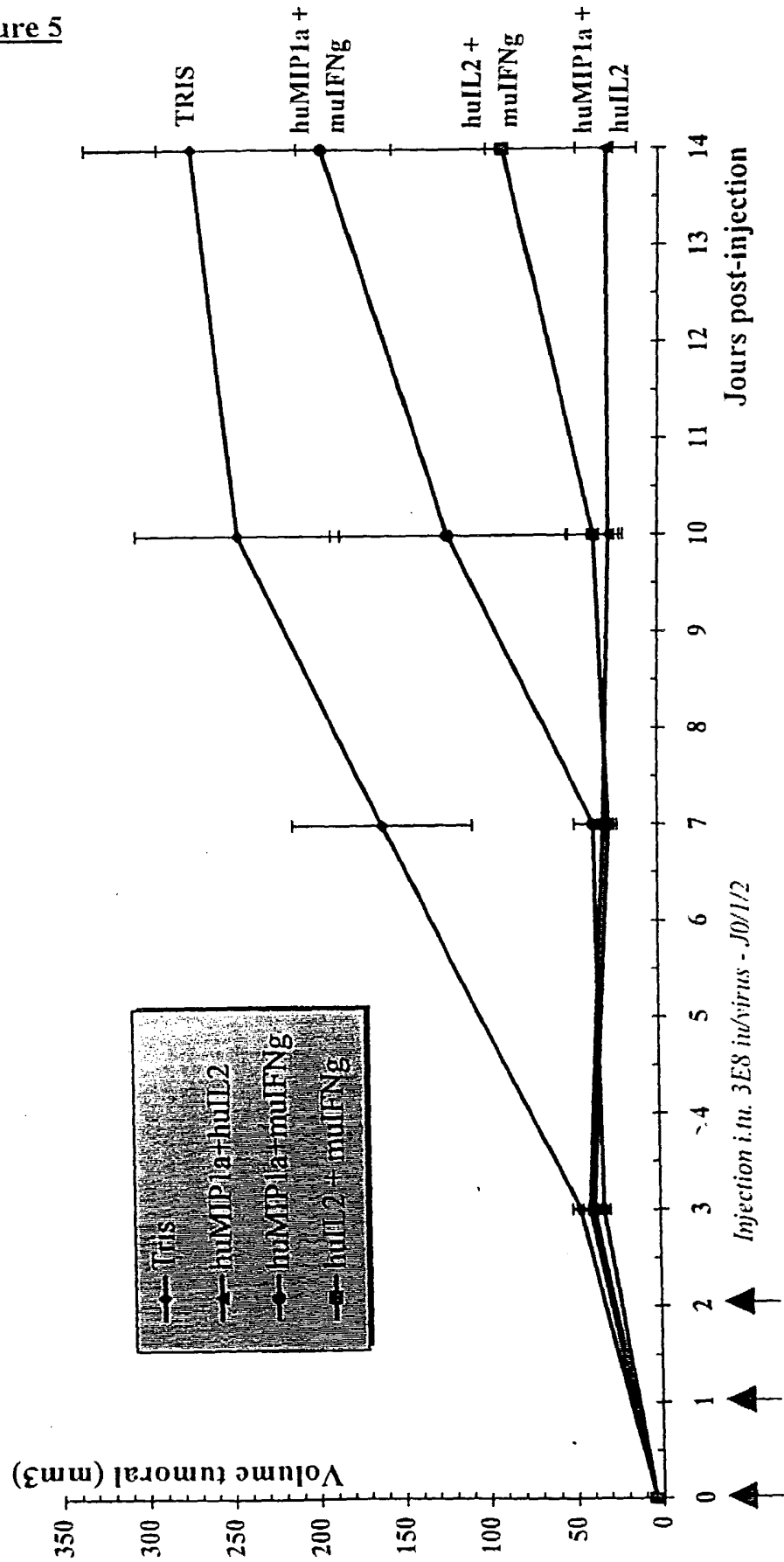


Figure 6

